

PCT/KR 2004/000752
RO/KR 29. 04. 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

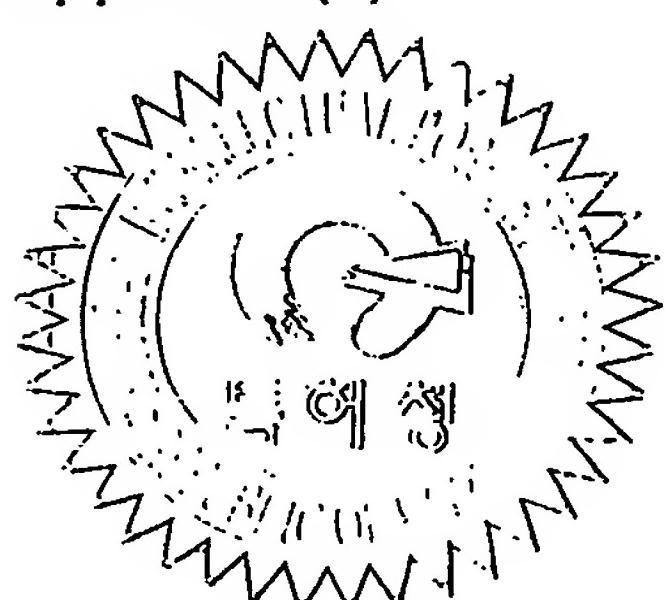
출원번호 : 10-2003-0020022
Application Number

출원년월일 : 2003년 03월 31일
Date of Application MAR 31, 2003

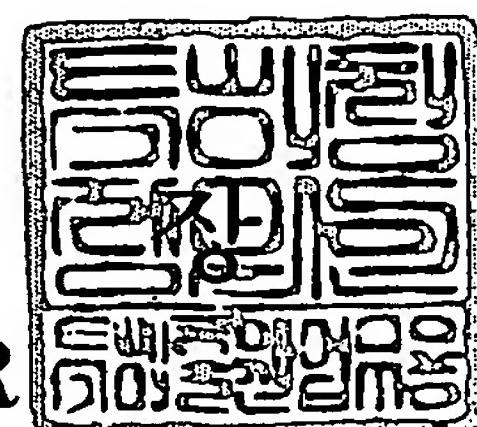
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

출원인 : 김영태 외 2명
Applicant(s) KIM Young Tae, et al.

2004 년 04 월 29 일



특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.03.31
【발명의 명칭】	아스타잔틴을 생산하는 해양 미생물, 파라코커스 해운대시스
【발명의 영문명칭】	Marine microorganism, Paracoccus haeundaeensis, producing astaxanthin
【출원인】	
【성명】	김영태
【출원인코드】	4-1998-039808-4
【출원인】	
【성명】	이원재
【출원인코드】	4-2003-011730-5
【출원인】	
【명칭】	주식회사 알진텍
【출원인코드】	1-2001-008962-2
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2003-019988-1
【포괄위임등록번호】	2003-019852-1
【포괄위임등록번호】	2003-004687-1
【발명자】	
【성명】	김영태
【출원인코드】	4-1998-039808-4
【발명자】	
【성명】	이원재
【출원인코드】	4-2003-011730-5
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터 (KCCM)
【수탁번호】	KCCM-10460
【수탁일자】	2003.01.24

【핵산영기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】	3	
【서열목록의 전자파일】	첨부	
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)	
【수수료】		
【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	14 면	14,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	2 항	173,000 원
【합계】		216,000 원
【감면사유】		소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】		64,800 원
【첨부서류】		1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통 3. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 해양 미생물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haewundaeensis*)에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미생물은 식품학적, 약학적 및 미용학적 등의 용도로 사용되는 아스타잔틴의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 7

【색인어】

파라코커스 속, 아스타잔틴, 카로티노이드

【명세서】

【발명의 명칭】

아스타잔틴을 생산하는 해양 미생물, 파라코커스 해운대시스{Marine microorganism, *Paracoccus haeundaesis*, producing astaxanthin}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 대수기(exponential stage) 배양 동안 본 발명의 균주를 투과 전자 현미경으로 관찰한 결과를 도시한 것으로서, 막대(bar)의 길이는 200nm이다.

도 2는 온도에 따른 본 발명의 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 3은 pH에 따른 본 발명의 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 4는 배양시간에 따른 본 발명의 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 5는 NaCl의 농도에 따른 본 발명의 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 16S rDNA 서열 데이터를 토대로 한 파라코커스 속 미생물의 계통도를 도시한 것으로서, 막대는 최대-파르시모니 거리(maximum-parsimony distance; 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides)를 나타낸다.

도 7은 본 발명에 따른 균주의 배양액으로부터 추출된 메탄올 추출액의 190-890 nm의 흡광도 변화(A) 및 400-550 nm의 흡광도 변화(B)에서 스캐닝한 결과를 도시한 것으로서, 450 nm의 피크는 β -카로텐이고 470 nm의 피크는 아스타잔틴의 고유 피크이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <8> 본 발명은 아스타잔틴(astaxanthin)을 생산하는 해양 미생물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haemandaes*)에 관한 것이다.
- <9> 카로티노이드(carotenoids)는 항산화 활성을 가지고 있는 C₄₀ 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로서, 자연계에 널리 분포되어 있는 한 군의 색소의 총칭을 말한다. 현재까지 알려진 카로티노이드는 6백여 종에 이르며, 이들은 각각 다른 형태로 존재한다. 카로티노이드는 분자 구조에 따라 노란색, 적색, 주홍색, 주황색 등 여러 색으로 존재한다. 그 예로는 β-카로텐(β-carotene; 당근의 주황색 색소), 리코펜(lycopene; 토마토의 적색 색소), 푸코잔틴(fucoxanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소) 등이 있다. 카로티노이드는 인체 내에서 비타민 A의 전구체로서의 역할을 하며, 산화 방지 효과와 유해산소 소거작용, 암세포 증식 억제작용 및 발암 억제작용이 강하여 순환기 질환, 암 및 성인병 등을 예방하는 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 최근에는 카로티노이드가 직접적인 자외선에 의한 신체의 면역기능을 향상시켜 자외선 노출로부터 피부의 손상을 줄여주거나 멜라닌 생성을 억제함이 밝혀지면서 유럽이나 미국에서 미용 소재로 각광을 받기 시작했다. 현재 카로티노이드는 건강식품 소재(영양 보충제), 인간을 대상으로 한 약학적 제제와 식품 착색제 또는 동물용 사료의 색소 등으로 사용되고 있다.

<10> 한편, 아스타잔틴(3, 3'-dihydroxy- β , β -carotene-4, 4'-dione)은 카로티노이드의 일종으로서 천연적으로 생산되는 주홍색 또는 붉은 오렌지색의 색소 물질이다. 아스타잔틴은 주로 새우, 붉은 도미류(red seabream), 연어(salmon) 및 바다가재(lobsters) 등과 같은 해양 동물 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다(Fujita et al., *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49: 1855-1869, 1983; Johnson, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11: 297-326, 1991; Nelis et al., *J. Appl. Bacteriol.* 70: 181-191, 1991). 아스타잔틴은 정상적인 호기적 대사과정 중 활성산소가 세포 내 DNA, 단백질, 지질 등을 손상시키는 것과 더불어 세포와 조직의 노화 및 발암을 유발하는 반응을 억제할 뿐만 아니라 유리 라디칼(hydroxy, peroxy radicals)의 생성을 억제하는 작용을 한다(Palozza et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 297: 291-295, 1992; Shimidzu et al., *Fish Sci.*, 62: 134-137, 1996). 또한, 아스타잔틴은 면역 조절 활성(immune modulatory activity) 및 심장 조절 효과(cardioprotective effect)를 갖는 것으로 알려졌다(Jyonuchi et al., *Nutr. Cancer.*, 19: 269-280, 1993). 특히, 아스타잔틴의 항산화력은 다른 카로티노이드의 10배 이상이고, α -토코페롤(tocopherol)의 100배 이상인 것으로 알려져 있다(Fang and Cheng, *J. Ferment. Bioeng.* 75: 466-469, 1993; Mik, *Pure Appl. Chem.* 63: 141-146, 1991). 또한, 현재까지 아스타잔틴의 독성(toxicity)에 대해서는 보고된 바 없다. 따라서, 아스타잔틴은 신경질환(neurodegenerative diseases), 암(cancer), 면역질환(immune disorders), 심장 혈관질환(cardiovascular diseases) 등을 포함하는 다양한 질환의 치료 및 예방에 이용되고 있고, 또한 이에 대한 연구가 계속 되고 있다(Beal, *The Neuroscientist*, 3: 21-27, 1991; Chew et al., *Anticancer Res.*, 19: 1849-1853, 1999; Murillo E., *Arch. Latinoam. Nutr.*, 42: 409-413, 1992). 또한, 아스타잔틴은 산업적으로 색소증진 물질로 이용되고 있으며, 우리나라에서는 '파피아 색소'라는 명칭으로 식품첨가물로 등록되어 있다. 이러한 이유로 아스타잔틴

의 수요는 매년 15% 이상의 소비성장을 보이고 있으며, 이에 따라 아스타잔틴의 중요성이 대두되고 있다.

<11> 최근에 스위스의 호프만-라로체(F. Hoffman-LaRoche) 사에서 아스타잔틴의 화학 합성법을 개발하였으나, 화학합성으로 제조된 아스타잔틴은 천연 아스타잔틴에 비해 낮은 생체 흡수율을 보이고, 식품 첨가제로서의 안전성에 문제가 되고 있어 유럽의 일부 국가에서만 사용이 허가된 상태이다. 따라서, 천연 아스타잔틴의 합성법에 관심이 집중되고 있으며, 아스타잔틴을 생산하는 미생물을 이용한 아스타잔틴의 제조에 상업적 관심이 일고 있다. 현재 아스타잔틴을 생산하는 것으로 알려진 미생물로는 효모인 파피아 로도지마(*Phaffia rhodozyma*; Miller et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 529-536, 1976), 녹색조류인 해마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*; Bubrick, *Bioresour Technol.*, 38: 237-239, 1991), 그람-양성균 브레비박테리움 103(*Brevibacterium 103*; Lizuka & Nishimura, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15: 127-134, 1969), 그람-음성균 아그로박테리움 아우란티아쿰(*Agrobacterium aurantiacum*; Yokoyama et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1842-1844, 1994), 파라코커스 마르쿠시아이(*Paracoccus marcusii*; Harker et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 543-548, 1998) 및 파라코커스 카로티니파시엔스(*Paracoccus carotinifaciens*; Tsubokura et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 277-282, 1999)가 알려져 있다. 그러나, 자연계에는 다양한 미생물이 존재하기 때문에, 아스타잔틴을 생산하는 신규 미생물을 분리·동정하고, 상기 미생물을 이용하여 아스타잔틴을 제조하려는 연구는 계속 요구되고 있다.

<12> 이에, 본 발명자들은 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 속의 신규 미생물을 분리·동정 함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<13> 본 발명의 목적은 아스타잔틴을 생산하는 신규 미생물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<14> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaeensis*)를 제공한다.

<15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<16> 본 발명은 아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaeensis*)를 제공한다.

<17> 상기 미생물은 부산 해운대 해안에서 채취한 바닷물 샘플로부터 오렌지 또는 붉은 색상을 띠는 균주로서 분리되었으며, 본 발명에 따른 균주의 특성을 조사한 결과, 상기 균주는 막대형(rod)의 그람-음성균이었으며, 또한 비운동성(non-motility)이었고, 포자(spore)를 형성하지 않았다(도 1 참조). 세포의 크기는 직경이 0.3-0.7 μm 이고, 길이가 0.8-2.5 μm 이었다. 콜로니는 붉은 빛의 오렌지색(주홍색)을 띠었다. 본 발명에 따른 균주의 최적 생장 온도는 25°C 이었으며, 10°C 이하 또는 40°C 이상에서는 전혀 생장하지 않았다(도 2 참조). 또한, 생장을

위한 최적 NaCl의 농도는 1-6%(w/w)이었으며, 8% 이상에서는 생장하지 않았다(도 4 참조). 최적 생장 pH는 8인 것으로 조사되었다(도 3 참조).

<18> 본 발명에 따른 균주는 생장을 위한 탄소- 및 에너지원으로 D-아라비노스(D-arabinose)와 갈락토스(galactose)만을 이용하였으며, 이외 다른 펜토스(pentoses), 헥소스(hexoses), 당알코올(sugar alcohols), 올리고당(oligosaccharides) 및 아미노산은 이용하지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 전분 가수분해 반응, 사이토크롬 산화효소(cytochrome oxidase)와 카탈라제(catalase) 반응에서 모두 양성으로 나타났다. 그러나, 우레아제 반응에서는 음성으로 나타났다. 또한, 트립토판(tryptophan)으로부터 인돌(indole)을 생성하지 못했으며, 구연산 테스트 결과 구연산을 이용하는 것으로 확인되었다. 탈질소화 반응(denitrification) 테스트에서 질산염(nitrate)을 아질산염(nitrite)으로 환원시켰으나, 아질산염을 N₂ 가스로 환원시키지는 못했다. 또한, 글루코스를 발효시키지 못했다. 본 발명에 따른 균주의 대사는 호기성(aerobic)인 것으로 조사되었다. 또한, DNA G+C 조성은 66.9 mol%이었다. 지방산 분석을 한 결과, 주 비수산화 지방산(non-hydroxyl fatty acid)은 불포화된 C_{18:1}이었으며, 주 수산화 지방산은 C_{10:0}(3-OH)이었다.

<19> 일반적으로 파라코커스 속 미생물은 산화효소와 카탈라제 양성인 그람-음성균으로서, 계통발생학적으로 프로테오박테리아의 α-3-아강(subclass)에 속한다. 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 균주가 프로테오박테리아 속한다는 것을 확인할 수 있었다.

<20> 이후, 본 발명자들은 본 발명에 따른 균주를 보다 구체적으로 동정하기 위하여 16S rDNA의 서열을 분석하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 균주의 16S rDNA의 염기서열은 파라코커스

마르쿠시아이(*Paracoccus marcusii*) 및 파라코커스 카로티니파시엔스()의 16S rDNA 염기서열과 매우 높은 상동성을 나타내었다. 그러나, 본 발명에 따른 균주는 상기 두 균주를 비롯한 다른 파라코커스 속 미생물과 다른 특성을 나타내었다(표 3 및 표 4 참조). 이로부터 본 발명자들은 본 발명에 따른 균주가 신규한 파라코커스 속 미생물임을 확인하였으며, 상기 균주를 '파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaesis*)'라 명명하였다.

- <21> 본 발명에 따른 파라코커스 해운대시스의 카로티노이드 생성 유무를 조사한 결과, 본 발명에 따른 균주는 β -카로텐(β -carotene)과 아스타잔틴을 생산하는 것을 확인하였다(도 7 참조). 본 발명자들은 본 발명에 따른 파라코커스 해운대시스를 2003년 1월 24일자로 한국 미생물 보존센터에 기탁하였다(기탁번호: KCCM - 10460).
- <22> 이상 살펴본 바와 같은 본 발명에 따른 파라코커스 해운대시스의 특성은 하기 표 1에 기재된 바와 같다.

<23> 【표 1】

본 발명에 따른 파라코커스 해운대시스의 특성

형태학적 특성	이용성	
세포 너비(μm)	0.3-0.7	D-글루코스(D-Glucose) -
세포 길이(μm)	0.8-2.5	말토스(Maltose) -
운동성	*-	D-갈락토스(D-Galactose) *+
포자 형성	-	수크로스(Sucrose) -
최적 생장 온도(℃)	25	만니톨(Mannitol) -
최적 생장 pH	8	셀로비오스(Cellobiose) -
염(NaCl) 내성(%)	7	트레할로스(Trehalose) -
생산물		자일로스(Xylose) -
인돌(Indole)	-	둘시토(Dulcito) -
MR(Methyl red test)	-	살리신(Salicin) -
VP(Voges-Proskauer test)	-	아도니톨(Adonitol) -
황화수소(Hydrogen Sulfide)	-	이노시톨(Inositol) -
구연산(citrate)	+	아라비노스(Arabinose) +
효소 활성		라피노스(Raffinose) -
카탈라제(Catalase)	+	람노스(Rhamnose) -
우레이제(Urease)	-	D-프루토스(D-Fructose) -
산화효소(Oxidase)	+	D-만노스(D-Mannose) -
전분 가수분해	+	디메틸포름아미드(Dimethylformamide) -
탈질소화 반응		글리세롤(Glycerol) -
질산염(Nitrate) → 아질산염(nitrite)	+	L-글루타민산(L-Glutamic acid) -
아질산염 → N ₂ 가스	-	솔비톨(Sorbitol) -
색소	+ (밝은 오렌지)	락토스(Lactose) -
화학분류적 특성 (Chemotaxonomic characteristics)		L-아스파라진(L-Asparagine) -
G + C 함량(mol%)	66.9	아세톤(Acetone) -
비-수소화산 (Non-hydroxyl acids)	C ₁₈ :1	주 생산 카로티노이드 아스타잔틴
3-수소화 지방산 (3-Hydroxyl fatty acids)	3-OH C ₁₀ :0	

<24>

*-: 양성 반응, *+: 음성 반응

<25>

본 발명에 따른 파라코커스 해운대시스는 카로티노이드, 특히 아스타잔틴을 제조하는데 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 미생물을 이용하여 카로티노이드를 제조하는 방법은 본 발명의 파라코커스 해운대시스를 생육가능한 배지에서 배양하고, 그 배양액으로부터 아

스타잔틴을 수거하는 것을 포함한다. 이 때 본 발명에 따른 균주를 PPEX-II 배지에서 25°C, 4 일간 1차 배양하고 배양액으로부터 균체를 회수한 후, 다시 균체에 유기용매를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 배양하여 아스타잔틴을 용출하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 균주를 배양하기 위한 배지로는 상기 PPES-II 배지 이외에 LB3 배지(LB 배지에 NaCl 3%가 추가된 배지)를 사용할 수 있다. 또한, 배양시 본 발명에 따른 균주의 원활한 생장과 아스타잔틴의 대량 생산을 위하여 상기 배지에 갈락토스를 첨가하는 것이 바람직하다. 상기 배양액으로부터 아스타잔틴을 용출하기 위한 유기용매로는 메탄올, 아세톤 또는 에틸에테르를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 메탄올을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 배양액으로부터 아스타잔틴의 수거는 HPLC(high performance liquid chromatography) 또는 TLC(thin-layer chromatography)를 이용하여 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.

- <26> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <27> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정 되는 것은 아니다.
- <28> <실시예 1> 샘플 채취, 미생물 분리, 배양 및 유지
- <29> 우리나라 부산 해운대 해안에서 채취한 바닷물(seawater) 샘플을 1/1000으로 희석한 후, 영양 배지(nutrient agar medium, Difco)에 도말하여, 25°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 미생물 중에서 카로티노이드계열인 오렌지 또는 붉은 색상을 띠는 미생물을 분리하였다. 최종 단일 균주로 분리된 후보 균주들 중에서 카로티

노이드를 생성하는 미생물을 분리하기 위해, 상기 후보 균주들을 PPES-II 배지(트립톤 1 g/l, 박토-소이톤 1 g/l, 페릭 시트레이트 0.01 g/l, 폴리펩톤 2 g/l 및 염화나트륨 3 g/l)에서 배양하였다. 이후, 배양액으로부터 균체를 수집한 후, 메탄올로 카로티노이드를 추출하여 카로티노이드를 생성하는 균주를 최종 선택하여 분리하였다. 분리된 미생물을 'BC74171^T 균주'라 명명하였다.

<30> <실시예 2> 표현형적 특성(phenotypic characteristics) 조사

<31> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주의 형태학적 및 생리학적 특성을 조사하기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다.

<32> <2-1> 형태학적 특성

<33> 먼저, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주를 PPES-II 배지에서 25°C, 3일 동안 배양하였다. 이후, 배양된 균체를 0.1M 인산 완충용액(phosphate buffer, pH 7.2)에 혼탁시켰다. 이후, 세포를 2% 글루타알데히드(glutaraldehyde)로 고정시킨 후, 0.05 M 카코딜산 완충용액(cacodylate buffer)으로 세척하고 1% 사산화 오스뮴(osmium tetroxide)으로 다시 고정시켰다. 고정된 세포를 에탄올에서 탈수(dehydration)시킨 후, 상기 에탄올을 프로필렌(propylene)으로 대체하였다. 이후, 상기 세포를 에폰 레진(EPON resin)에 박아 넣은 후, 초마이크로톰(ultramicrotome)을 이용하여 절편(section)을 제작하였다. 이후, 제작된 절편을 JEM 1200EX-II 투과 전자 현미경(transmission electron microscope; TEM)을 이용하여 관찰하였다.

<34> 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 막대형(rod)이었으며, 그 크기는 직경이 0.3-0.7 μm이고, 길이는 0.8-2.5 μm이었다. 또한, 포자(spore)를 형성하지 않았다. 현적법(hanging-drop technique; Skerman, V. B. D., *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd edn. Baltimore, 1967*)으로 광학 현미경 하에서 균주의 운동성(motility)을 조사한 결과, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 비운동성(non-motile)이었다. 또한, BC74171^T 균주는 그람 음성이었으며, 배지 상에 자라난 콜로니는 평평하고 밝은 오렌지색이었다.

<35> <2-2> 생리학적 특성

<36> 1. 온도 범위

<37> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주를 영양 배지(Difco)에서 각 온도별(4, 10, 20, 25, 28, 30, 37, 40 및 50°C)로 10일간 배양하여 생장 온도 범위를 조사하였다. 그 결과, BC74171^T 균주는 20-37°C에서 생장하는 것으로 나타났으며, 최적 생장 온도는 25°C로 나타났다(표 1 및 도 2).

<38> 2. pH 범위

<39> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주를 각 pH(3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 10.5 및 11.0)의 PPES-II 배지에서 10일간 배양하여 생장 pH 범위를 조사하였다. 그 결과, 최적 생장 pH는 8인 것으로 나타났다. pH 6 이하와 pH 10.5 이상에서는 생장이 느려지거나 억제되었다(표 1 및 도 3).

<40> 3. 생장(growth)

<41> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주를 PPES-II 배지에서 25℃에서 10일 동안 진탕 배양한 후에 탁도(turbidity)를 측정하여 생장을 조사하였다. 그 결과, 배양 후 30시간부터 급격히 생장이 증가하다가 50시간 이후부터는 서서히 감소하였다(도 4).

<42> 4. 염(NaCl) 내성

<43> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주를 1-10%(w/v)의 NaCl을 포함하는 트립티카제 소이 배지 (trypticase soy broth)배지에서 각 온도별(4, 10, 20, 25, 28, 30, 37, 40 및 50℃)로 10일간 배양하였다. 그 결과, 생장을 위한 최적 NaCl의 농도는 1-6%인 것으로 나타났으며, 7%에서는 생장이 느려졌고, 8% 이상에서는 전혀 생장하지 않았다(표 1 및 도 5).

<44> 5. 탄소원의 이용능력 테스트

<45> 탄소원의 이용능력 테스트는 하기 표 2에 기재된 총 24개의 기질을 포함하는 마이크로 플레이트를 이용하여 수행하였다. 각 기질을 최종농도 1%(salicin 0.5%)가 되도록 하여 당기 초배지인 퍼플 브로쓰 베이스(purple broth base, Difro)에 여과 또는 습열멸균하여 가하였다. 이후, 상기 배지에 본 발명의 균주를 접종하여 25℃에서 10일간 배양하였다. 이후, 양성반응은 노란색으로, 음성반응은 원래 배지색인 보라색으로 하여 결과를 확인하였다.

<46> 【표 2】

탄소원 이용능력 테스트에 사용된 기질 및 이용능력

	기질	이용 능력		기질	이용 능력
1	D-글루코스(D-Glucose)	*-	13	아라비노스(Arabinose)	+
2	말토스(Maltose)	-	14	라피노스(Raffinose)	-
3	D-갈락토스(D-Galactose)	*+	15	람노스(Rhamnose)	-
4	주크로스(Sucrose)	-	16	D-프룩토스(D-Fructose)	-
5	만니톨(Mannitol)	-	17	D-만노스(D-Mannose)	-
6	셀로비오스(Cellobiose)	-	18	디메틸포름아미드(Dimethylformamide)	-
7	트레할로스(Trehalose)	-	19	글리세롤(Glycerol)	-
8	자일로스(Xylose)	-	20	L-글루타민산(L-Glutamic acid)	-
9	둘시톨(Dulcitol)	-	21	솔비톨(Sorbitol)	-
10	살리신(Salicin)	-	22	락토스(Lactose)	-
11	아도니톨(Adonitol)	-	23	L-아스파라진(L-Asparagine)	-
12	이노시톨(Inositol)	-	24	아세톤(Acetone)	-

<47> *-: 이용하지 않음(양성 반응), +: 이용함(음성 반응)

<48> 그 결과, 상기 표 2에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 D-아라비노스 와 갈락토스만을 탄소원으로 이용하였으며, 이 외 다른 기질들은 전혀 이용하지 않는 것으로 확인되었다.

<49> 6. 전분 가수분해(starch hydrolysis) 활성

<50> 본 발명에 따른 균주가 전분을 가수분해하는지 확인하기 위하여, 전분 아가(starch agar)에 균주를 접종한 후, 10일 동안 배양한다. 가수분해 여부는 코완 및 스틸의 방법 (Cowan, S. T. & Steel, K. J., *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. London: Cambridge University Press, 1965)으로 전분 가수분해 활성을 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 균주는 전분 가수분해 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(표 1).

<51> 7. 인돌(indole) 검사(트립토판 활성)

<52> 본 발명에 따른 균주가 트립토판(triptophan)을 분해하여 인돌을 생성하는지 확인하기 위하여, 카푸치노 등의 방법(Cappuccino J. G. and Sherman, N. In *Microbiology: a laboratory manual (6th)* 2001)에 따라 조사한 결과, 트립토판(triptophan)으로부터 인돌(indole)이 생성되지 않음을 확인하였다(표 1).

<53> 8. 탄수화물(carbohydrates)로부터의 산 생성(Fermentation)

<54> 휴그 등의 방법(Hughm et al., *J. Bacteriol.*, 66: 24-26, 1953)에 따라 산 생성 능력을 조사하였다. 이를 위해 메틸-레드 테스트(Methyl Red test)와 보게스-프로스카우어 테스트(Voges-Proskauer test)를 수행한 결과, 모두 음성으로 나타났다(표 1).

<55> 9. 구연산 이용 테스트

<56> 본 발명에 따른 균주가 구연산을 탄소원으로 이용하여 자랄 수 있는지 확인하기 위하여, 카푸치노 등의 방법(Cappuccino J. G. and Sherman, N. In *Microbiology: a laboratory manual (6th)* 2001)에 따라 조사한 결과, 양성으로 나타났다(표 1).

<57> 10. 카탈라제(catalase) 활성

- <58> 카탈라제 활성은 하커 등의 방법(Harker et al., *J. Clin. Microbiol.*, 2: 463-464, 1975)에 따라 3% 과산화수소 용액에서 기포(bubble)의 존재를 조사함으로써 수행하였다. 그 결과, 카탈라제 활성은 양성으로 확인되었다(표 1).
- <59> 11. 산화효소(oxidase) 활성
- <60> 산화효소 활성은 카푸치노 등의 방법(Cappuccino J. G. and Sherman, N. In *Microbiology: a laboratory manual (6th)* 2001)에 따라 1% p-아미노디메틸아닐린 옥살레이트(p-aminodimethylaniline oxalate)를 기질로 하여 측정하였다. 그 결과, 사이토그롬 산화효소 활성은 양성으로 확인되었다(표 1).
- <61> 12. 우레아제(urease)의 생성
- <62> 우레아제 활성은 라니의 방법(Lanyi, B. *Methods Microbiol.*, 19: 1-67, 1987)의 방법에 따라 측정하였다. 그 결과, 우레아제 활성은 음성으로 확인되었다(표 1).
- <63> 13. 탈질소화 반응(denitrification)
- <64> 탈질소화 반응은 카푸치노 등의 방법(Cappuccino J. G. and Sherman, N. In *Microbiology: a laboratory manual (6th)* 2001)에 따라 0.1%(w/v) 아가를 포함하는 영양 배지를 이용한 천자 배양(stab culture)에서 가스(gas)의 생성과 생장을 조사하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주가 질산염(nitrate)을 아질산염(nitrite)으로 환원시키는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 아질산염을 N₂ 가스로 환원시키지는 못했다(표 1).

<65> 14. 황화수소(hydrogen sulfide) 생성 테스트

<66> 본 발명에 따른 균주가 시스테인과 같은 황을 포함한 아미노산이나 무기 황화합물과 같은 기질로부터 황화수소를 생성시키는 능력이 갖고 있는지 조사하기 위하여, TSI(Triple Sugar Iron Agar) 배지를 이용하여 황화수소 생성 테스트를 수행하였다(Cappuccino J. G. and Sherman, N. In *Microbiology: a laboratory manual (6th)* 2001). 그 결과, 음성으로 나타났다(표 1).

<67> <실시예 3> 지방산 분석(fatty acid analysis)

<68> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주를 2% NaCl이 첨가된 트립티카베 소이 아가 배지(pH 8.0)에서 25°C, 2일 동안 배양하였다. 이후, 사세(Sasser, M. In *Methods in Phytopathology*, 199-204, 1990)의 방법에 따라 배양된 균체의 수집(harvesting), 비누화(saponification), 메틸화(methylation) 및 FAMEs(fatty acid methyl esters)의 추출을 수행하였다. 이후, 립스키(Lipski et al., *Syst. Appl. Microbiol.*, 20: 448-457, 1997) 등의 방법에 따라 GC-MS를 수행하여 추출된 FAMEs를 확인하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주의 지방산 프로파일($C_{18:1}$, 84.32 %; $C_{18:0}$, 7.79 %; $C_{10:0}$ (3-OH), 2.06 %; $C_{12:1cis5}$ 2.0 %; $C_{14:0}$ (3-OH), 1.47 %; $C_{17:0}$, 0.80 %; $C_{16:0}$, 0.78 %; 및 미지의 피크, 0.78 %)은 프로테오박테리아(Proteobacteria)의 α-아강(subclass)에 속하는 특성으로 확인되었다. 주 수산화 지방산(hydroxyl fatty acid)은 $C_{10:0}$ (3-OH)이었다(표 1).

<69> <실시예 4> DNA 염기 조성

<70> 본 발명에 따른 BC74171^T 균주의 게노믹 DNA의 염기 조성은 타마오카 등의 방법(Tamaoka, J. & Komagata, K. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25: 125-128, 1984)에 따라 결정하였다. 먼저, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주로부터 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 게노믹 DNA를 추출한 후, 이를 가수분해하였다. 이후, 얻어진 뉴클레오티드들을 역상 HPLC(reverse-phase HPLC)로 분석하였다. 그 결과, BC74171^T 균주의 DNA의 G+C 함량은 66.9 mol%로 확인되었다(표 1).

<71> <실시예 5> 16S rDNA 서열 결정 및 계통도 분석

<72> 라이네이 등의 방법(Rainey et al., *Syst. Appl. Microbiol.*, 15: 197-202, 1992)에 따라 본 발명에 따른 BC74171^T 균주로부터 게노믹 DNA를 추출한 후, 서열번호 1과 서열번호 2로 기재되는 프라이머를 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR 반응조건은 게노믹 DNA 10 ng, Taq 중합효소 1 unit, 10 ×완충용액(with MgCl₂) 및 각 프라이머 20 pmol을 총 반응용액으로 하여 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 전변성화시킨 후, 94°C에서 1분; 56°C에서 30초; 및 72°C에서 1분 30초를 한 사이클(cycle)로 하여 총 25회 반복수행한 후, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, PCR 산물을 pGEM-T 벡터(Promega)에 클로닝한 후, 분리된 DNA 클론을 ABI PRISM™ 염색 시약(Perkin Elmer, USA)과 반응시켰다. ABI 377 제네틱 분석기(ABI 377 genetic analyzer, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

<73> 그 결과, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주의 16S rDNA의 크기는 1451bp이었으며, 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 가졌다. 또한, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주의 16S rDNA의 염기 서열을 NCBI GenBank 데이터베이스의 BLASTN과 BLASTX를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 본

발명에 따른 BC74171^T 균주의 16S rDNA의 염기서열은 다양한 파라코커스 속 미생물 중에서도 아스타잔틴을 생산하는 것으로 알려진 파라코커스 마르쿠시아이(*Paracoccus marcusii*) 및 파라코커스 카로티니파시엔스(*Paracoccus carotinifaciens*)와 각각 99.8%와 99.6%의 높은 상동성을 나타내었다.

<74> 이에, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 파라코커스 속 균주로 판명되어 본 발명의 균주의 특성을 다양한 파라코커스 속 미생물과 비교하여 보았다. 하기 표 3에 기재된 2-15의 다른 파라코커스 속 미생물의 특성은 할커 등(Harker et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 543-548, 1998), 립스키 등(Lipski et al., *Syst. Appl. Microbiol.*, 20: 448-457, 1997), 츄보쿠라 등(Tsubokura et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 277-282, 1999), 켈리 등(Kelly et al., *The genus Paracoccus. In The Prokaryotes*, <http://www.prokaryotes.com>, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer., 2000) 및 도로니나 등(Doronina et al., *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, 52: 679-6, 2002)에 의해 연구된 결과이다. 하기 표 3에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 어떤 파라코커스 속 미생물과도 동일한 특성을 갖지 않았다.

<75> 【표 3】

본 발명의 균주와 다른 파라코커스 속 미생물과의 특성 비교

	*1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
운동성	*-	-	-	-	-	*+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6% NaCl 에서 성장	+	-	*NR	-	-	NR	-	-	-	*W	NR	NR	-	NR	NR
이용성	글루코스	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
아라비노스	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
글리세롤	-	+	-	+	+	NR	+	-	+	+	+	+	-	-	+
수크로스	-	-	-	-	-	NR	+	-	-	+	+	+	-	-	+
만니톨	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
프럭토스	-	+	-	-	+	NR	+	-	+	+	+	+	-	+	+
탈질소화 반응	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
우레아제 활성	-	+	NR	-	-	-	+	-	+	NR	+	-	NR	-	-
노랑색 색소	+	-	NR	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
G + C 함량 (mol%)	66.9	64- 66	NR	63	67	67	64- 67	71	62.5	66	67	66	68.5 -70	66.5- 67.6	67- 68

<76> *1: 본 발명의 균주 2: *P. alcaliphilus*(JCM 7364^T)<77> 3: *P. alkenifer*(DSM 11593^T) 4: *P. aminophilus*(JCM 7686^T)<78> 5: *P. aminovorans*(JCM 7685^T) 6: *P. carotinifaciens*(IFO 16121^T)<79> 7: *P. denitrificans*(ATCC 17741^T) 8: *P. kocurii*(JCM 7684^T)<80> 9: *P. kondratievae*(VKM B-2222^T) 10: *P. marcusii*(DSM 11574^T)<81> 11: *P. methylutens*(VKM B-2164^T) 12: *P. pantotrophus*(ATCC 35512^T)<82> 13: *P. solventivorans*(DSM 6637^T) 14: *P. thiocyanatus*(IAM 12816^T)<83> 15, *P. versutus*(ATCC 25364^T)

<84> *+: 양성 반응 -: 음성 반응

<85> W: 약한 반응(weak reaction) NR: 보고되지 않음(not reported)

<86> 특히, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 가장 높은 16S rDNA 서열 상동성을 보인 파라코커스 마르쿠시아이 및 파라코커스 카로티니파시엔스와도 여러 면에서 다른 특성을 나타내었다. 보다 구체적으로 살펴보면, 하기 표 4에서 보는 바와 같이, 파라코커스 마르쿠시아이(Harker et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 48: 543-548, 1998)는 짧은 연쇄(chain)를 형성하는 구균 또는 짧은 막대형이다. 그러나, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 연쇄를 형성하지 않는 막대형이다. 한편, 파라코커스 카로티니파시엔스(Tsubokura et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 277-282, 1999) 또한 연쇄를 형성하지 않는 막대형으로 편모(flagella)를 가진다. 그러나, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 편모를 가지지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 글루코스, 만니톨, 말토스 및 만노스를 이용하지 않는 반면, 상기 두 균주는 이들 모두를 이용한다. 나아가, 본 발명에 따른 BC74171^T 균주는 전분을 분해하는 반면, 상기 두 균주는 분해하지 못한다.

<87> 【표 4】

본 발명의 균주와 다른 파라코커스 속 미생물과의 특성 비교

특성	본 발명에 따른 균주 (BC74171 ^T)	파라코커스 마르쿠시아이 (<i>Paracoccus marcusii</i>)	파라코커스 카로티니파시엔스 (<i>Paracoccus carotinifaciens</i>)							
세포 형태	막대형	구균 또는 짧은 막대형	막대형							
운동성	-*	-	+*							
이용성	글루코스 말토스 만니톨 아라비노스 구연산 만노스	- - - + + -	+	+	+	+	-	-	NR*	+
전분 가수분해	+	-	-							
색소	+	+	+							

<88> *+: 양성 반응, -: 음성 반응, NR: 보고되지 않음(not reported)

<89> 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 BC74171^T 균주가 파라코커스 속에 속하는 신규한 미생물임을 확인하였다. 본 발명자들은 상기 BC74171^T 균주를 '파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaensis*)'라 명명하고 2003년 1월 24일자로 한국 미생물 보존센터에 기탁하였다(기탁번호: KCCM-10460). 또한, 파라코커스 속 미생물 내에서 본 발명에 따른 파라코커스 해운대시스의 계통학적 위치를 도 6에 도시하였다. 계통 분류도(phylogenetic dendrogram)는 트리뷰(Treeview) 프로그램을 이용하여 작성하였다. 부트스트랩(bootstrap) 분석(1000 replications)은 거리(distance) 및 파르시모니(parsimony) 방법(Agnes Groisillier and Aline Lonvaud-Funel, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1417-1428, 1999)을 이용하여 수행하였다.

<90> <실시예 6> 본 발명에 따른 균주로부터 아스타잔틴의 생산

<91> 본 발명에 따른 균주를 50 ml의 배지(효모 추출물 1%, 트립تون 0.5%, NaCl 3%)에서 25°C, 6일간 배양하였다. 이후, 13,000 rpm에서 원심분리하여 균체를 회수하였다. 메탄올 20 ml로 균체를 혼탁한 후, 4°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다시 13,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 190-900 nm의 파장에서 흡광도를 스캐닝하였다.

<92> 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, 450 nm 및 470 nm에서 피크(peak)를 확인하였으며, 상기 피크들이 각각 β-카로텐과 아스타잔틴의 고유 피크임을 확인하였다.

<93> 보다 정확한 분석을 위해, 상기 상등액 1 ml를 취하여 직경 0.45 μm의 필터로 여과한 후, HPLC 분석(column: 4.6 × 250 mm, uBondapak C18, Waters, Milford, MA; mobile phase:

acetonitrile-methanol-water(49:44:7 v/v), Flow: 10 ml/min, Detector: 470 nm)을 수행하였다. 이 때 표준물질로는 시그마(Sigma)에서 구입한 β -카로텐과 아스타잔틴을 사용하였다. 그 결과, 본 발명의 균주로부터 생산된 물질이 아스타잔틴과 β -카로텐임을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명에 따른 균주로부터 생산된 아스타잔틴의 양은 25 $\mu\text{g/g}$ (dry weight)이었다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 균주의 밝은 오렌지 색상이 세포내 카로티노이드 생합성으로부터 기인한다는 것과 세포내 축적된 주 색소가 아스타잔틴인 것을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

<94> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 카로티노이드 중에서도 아스타잔틴을 주생산하는 파라코커스 속 신규 미생물을 분리·동정하였으며, 상기 미생물을 이용하여 아스타잔틴을 제조할 수 있음을 확인하였다. 본 발명에 따른 미생물과 이를 이용한 방법은 식품학적, 약학적 및 미용학적 등의 용도로 사용되고 있는 아스타잔틴의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

아스타잔틴을 생산하는 파라코커스 해운대시스(*Paracoccus haeundaensis*)(기록번호: KCCM-10460).

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 서열번호 3으로 기재되는 16S rDNA의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 파라코커스 해운대시스.

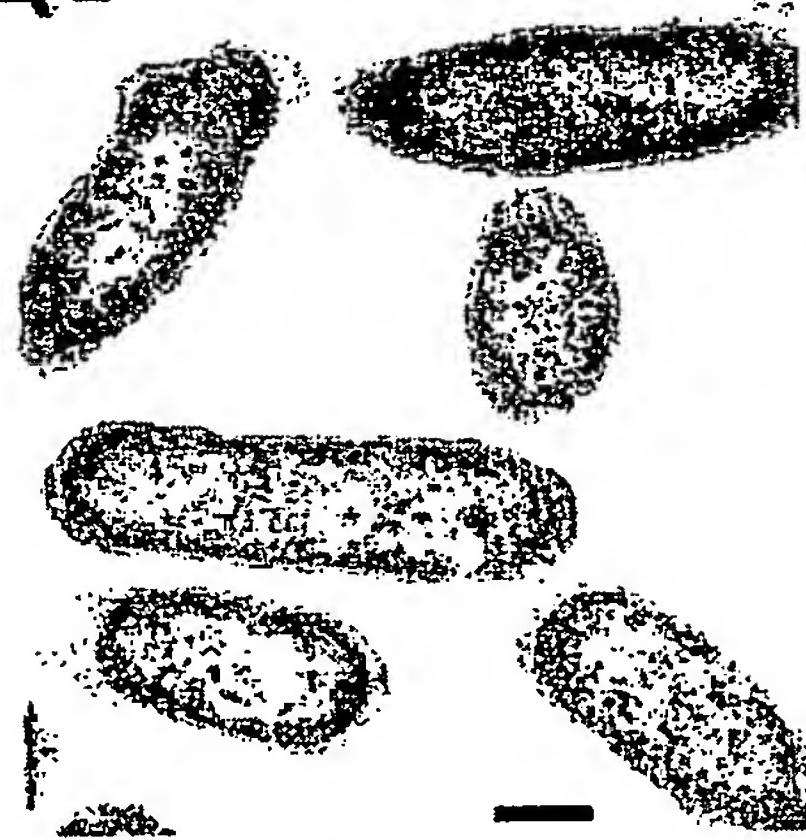
102 20022

출력 일자: 2004/5/7

【도면】

【도 1】

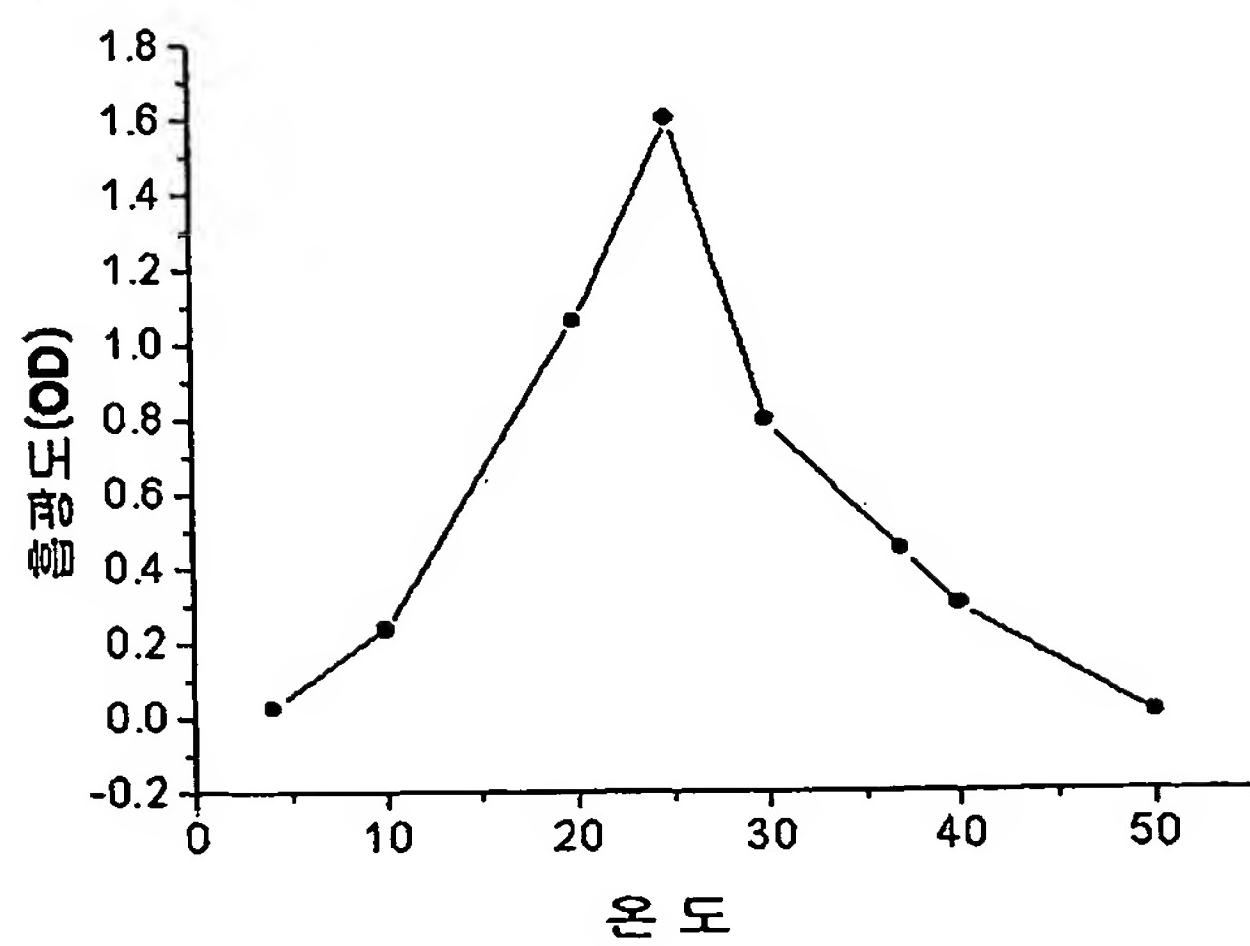
A-



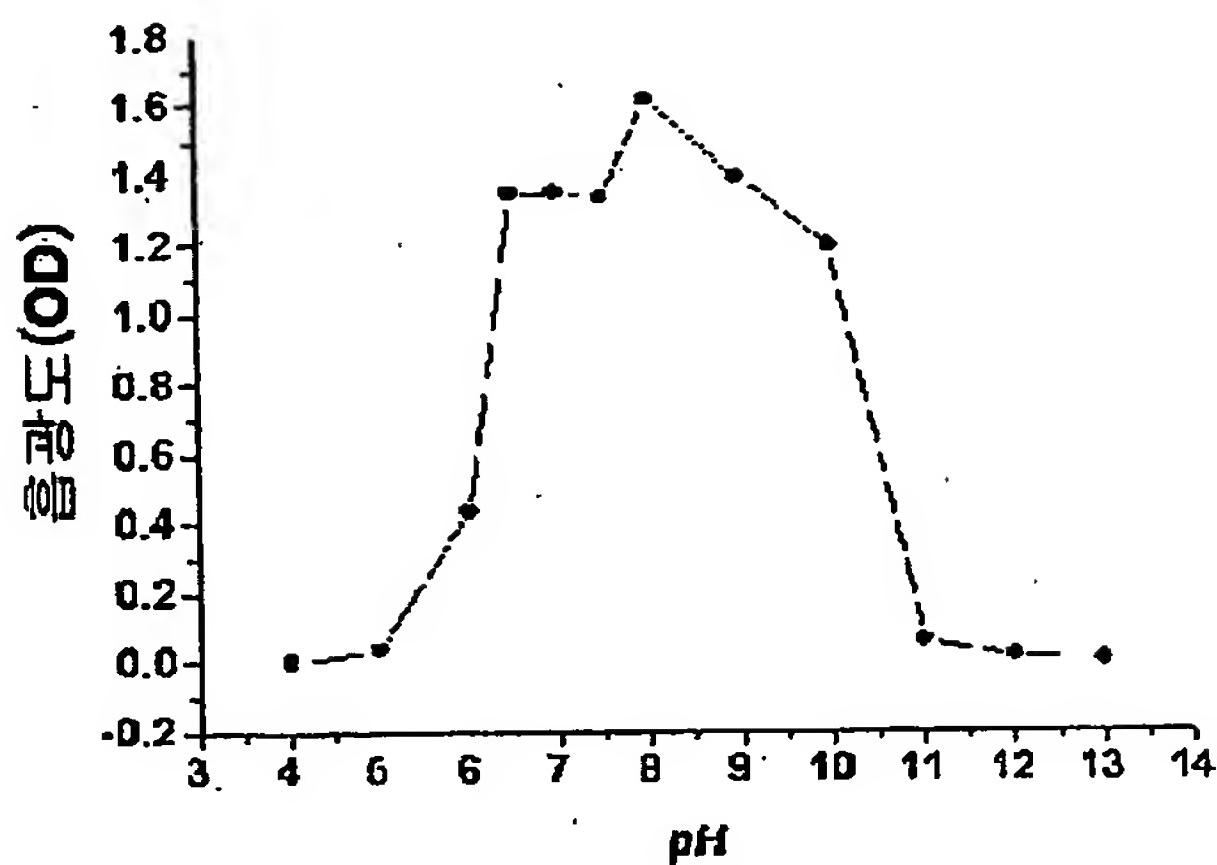
B



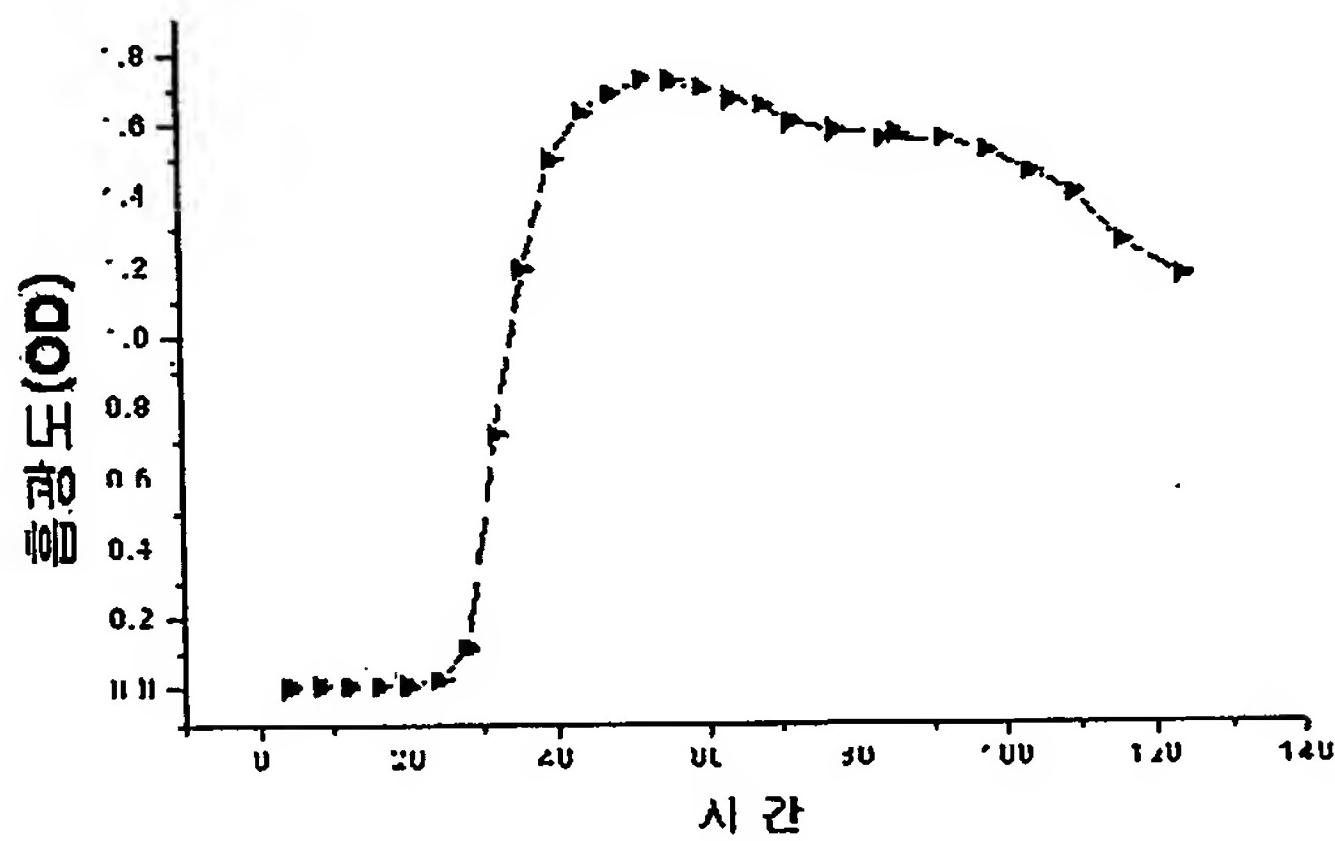
【도 2】



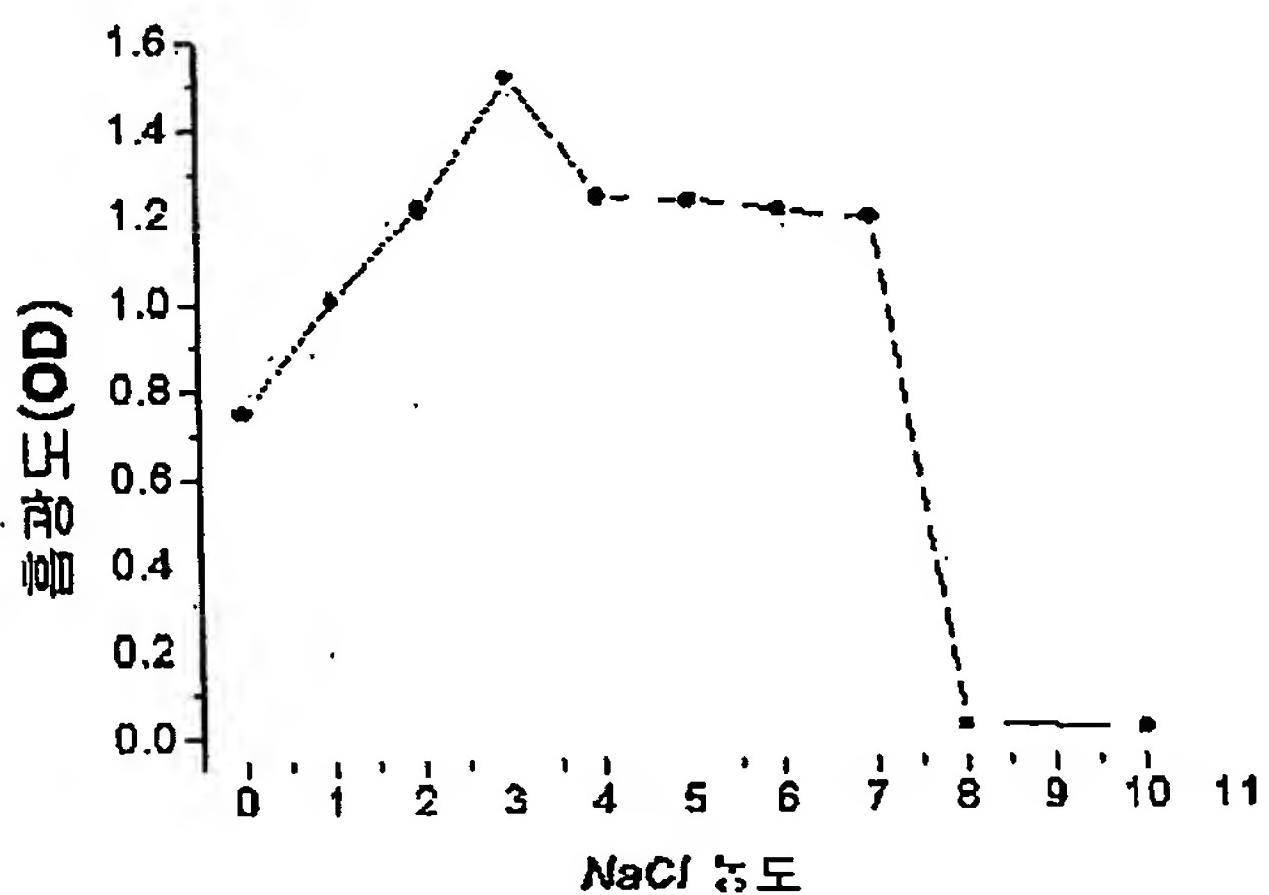
【도 3】



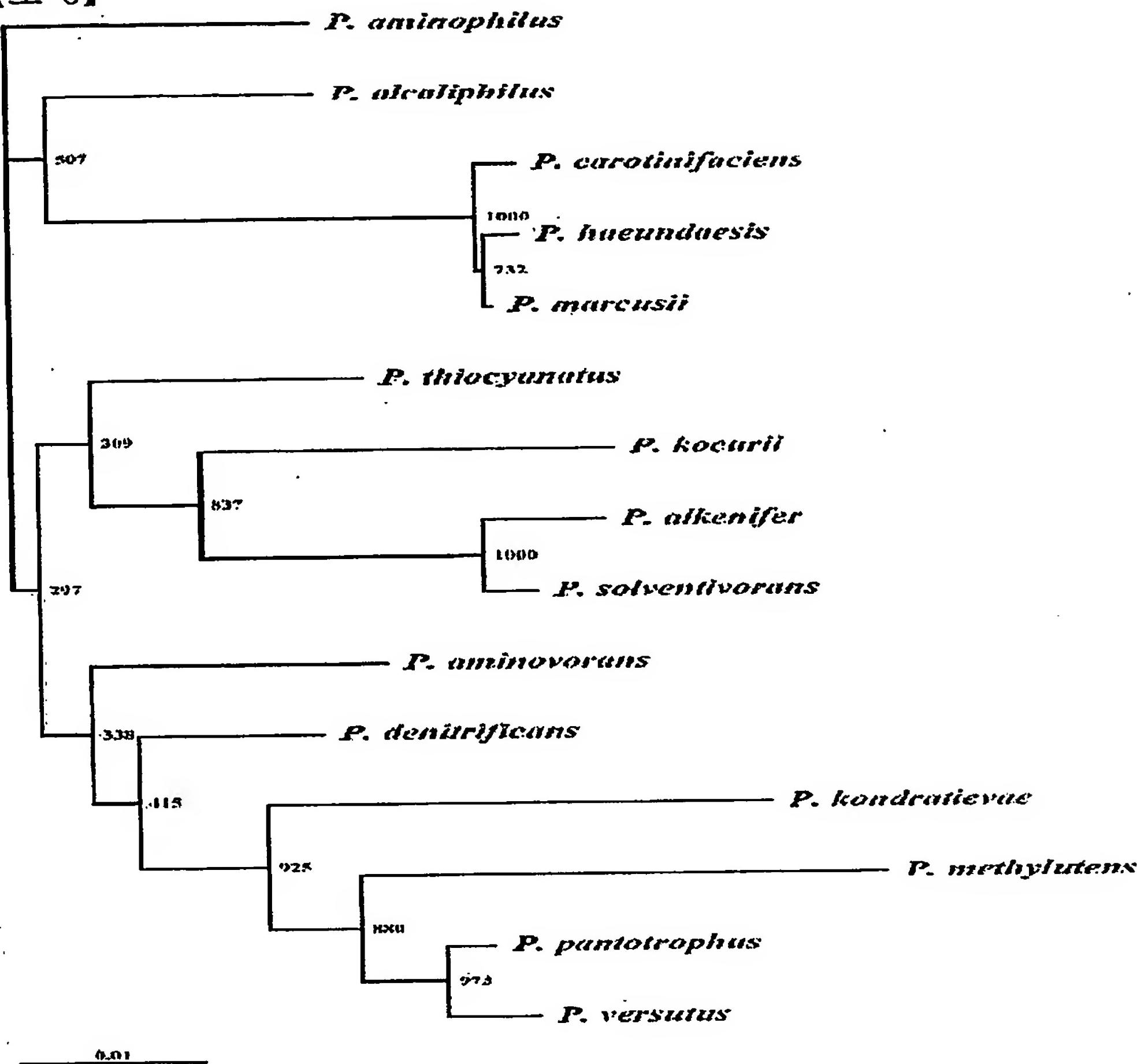
【도 4】



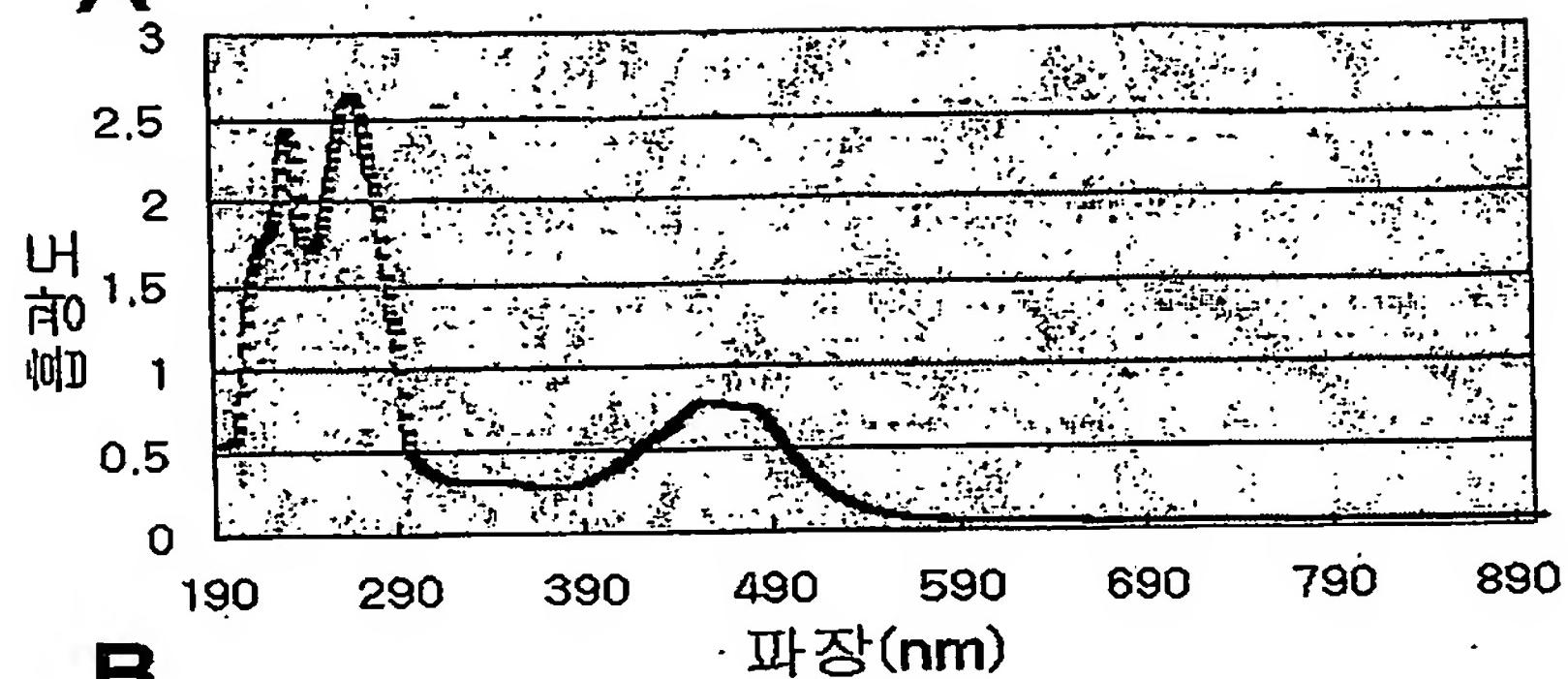
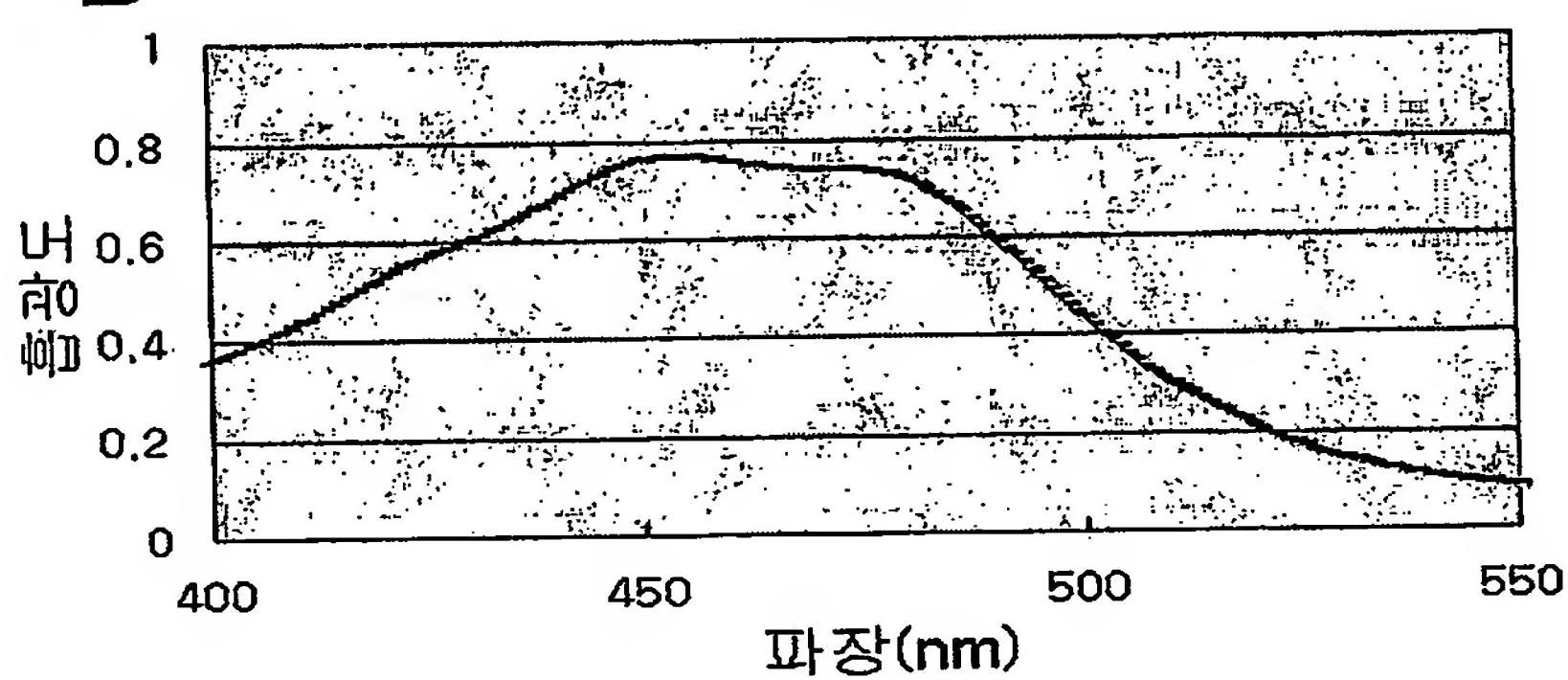
【도 5】



【도 6】



【도 7】

A**B**

【서열목록】

<110> KIM, Young Tae	LEE, Won Jae	ALGENETECH <120>	Marine microorganism, Paracoccus haeundaeensis, producing astaxanthin <130>	3p-01-05 <160>	3 <170>	KopatentIn 1.71 <210>
1 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>					forward primer for Paracoccus haeundaeensis 16S rDNA <400>	
	1 cataagtaat tatggtttig t					
21 <210> 2 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>					reverse primer for Paracoccus haeundaeensis 16S rDNA <400>	
	2 cgcttcctta gaaaggag					
18 <210> 3 <211> 1454 <212> DNA <213> Paracoccus haeundaeensis <400>					3 caacttgaga gtttgatcct	
ggctcagaac gaacgctggc ggcaggctta acacatgcaa				60 gtcgagcgag accttcgggt ctagccggcgg acgggtgagt		
aacgcgtggg aacgtgccct	120 tctctacgga atagccccgg gaaaactggga gtaataccgt ataccccctt tggggaaaag					
180 atttatcgga gaaggatcg ccgcgttgg attaggtat tggtgggta atggcccacc			240 aagccgacga tccatagctg			
gtttgagagg atgatcagcc acactggac tgagacacgg	300 cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatcttagac					

aatggggca accctgatct 360 agccatgccg cgtgagtgt gaaggccta gggttgtaaa gctcttcag ctggaaagat
420 aatgacggtta ccagcagaag aagccccggc taactccgtg ccagcagccg cgtaatacg 480 gagggggcta gcgttgtcg
gaattactgg gcgtaaagcg cacgtggcg gactggaaag 540 tcagaggtga aatcccaggc ctcaaccttg gaactgcctt
tcaaactatc agtctggagt 600 tcgagagagg tgagtggaaat tccgagtgt aaggtgaaat tcgttagatat tcggaggaac
660 accagtggcg aaggcggctc actggctcg tactgacgct gaggtgcgaa agcgtgggaa 720 gcaaacagga tttagatacc
tggttagtcca cgccgtaaac gatgaatgcc agacgtcg 780 aagcatgctt gtccgtgtca cacctaacgg attaagcatt
ccgcctgggg agtacggtcg 840 caagattaaa actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtgaggc atgtggttt
900 attcgaagca acgcgcagaa cttaccaac cttgacatg gcaggaccgc tggagagatt 960 cagctttctc gtaagagacc
tgcacacagg tgctgcatgg ctgtcgtag ctcgtgtcg 1020 gagatgttcg gtaagtccg gcaacgagcg caacccacgt
ccctagttgc cagcattcag 1080 ttggcactc tatggaaact gccgatgata agtcggagga aggtgtggat gacgtcaagt
1140 tctcatggcc cttacgggtt gggctacaca cgtgctacaa tggtggtgac agtgggttaa 1200 tccccaaaag ccatctcagt
tcggattgtc ctctgcaact cgagggcatg aagtggaaat 1260 cgctagtaat cgccgaacag catgcccg tgaatacgtt
ccggccctt gtacacaccg 1320 cccgtcacac catggaggtt ggttctaccc gacgacgctg cgtaacctt cggggggcag
1380 gcggccacgg taggatcagc gactgggtg aagtgcgtaac aaggtagccg taggggaacc 1440 tgccgtgga tcac
1454